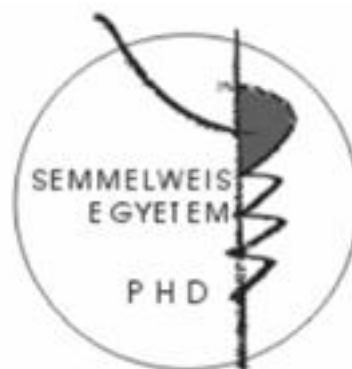


Citokinekre vonatkozó génpolimorfizmus vizsgálatok jelentősége szisztémás masztocitózisban

Doktori tézisek

Dr. Rausz Eszter Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Várkonyi Judit Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Laura Ph.D, egyetemi adjunktus,
Dr. Szalai Zsuzsanna Ph.D, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Sótónyi Péter D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rónai Zsolt Ph.D, egyetemi adjunktus
Dr. Kiss Csaba Ph.D, főorvos

Budapest
2014

Bevezetés

A népesség jelentős részét érintő patológias állapotok, mint a szív-, és érrendszeri megbetegedések, az autoimmun folyamatok, a malignus betegségek kialakulásában polietiológiai eredet valószínű, azaz a környezeti tényezők a megfelelő genetikai hajlam esetében alakítják ki a manifeszt kórképet.

A molekuláris genetikai vizsgálómódszerek általános elterjedésével a klinikai gyakorlat számára új diagnosztikai lehetőségek váltak elérhetővé és ezzel megvalósíthatóvá vált az individuális és célzott terápia.

Az egyes emberek génállományukban lévő variábilis szakaszok alapján különböznek egymástól. A populációban 1 %-nál ritkább gyakorisággal előforduló szekvencia változatokat polimorfizmusnak nevezzük, melyek esetében az emberekben egy adott tulajdonság kialakulásának valószínűsége tér el egymástól.

A ritka betegségek bizonyos polimorfizmusok szempontjából történő tanulmányozása közelebb vihet a betegségre való hajlam megismeréséhez, segít annak tisztázásához, mi az egészség megőrzésének feltétele egy genetikai hajlam ismeretében illetve mi lehet a kezelés módja, ha már a betegség kialakult. Ilyen ritka megbetegedés a masztocitózis, melyre a hízósejtek proliferációja jellemző.

A hízósejtek érésében és differenciálódásában számos humoralis tényező játszik szerepet, melyek közül doktori munkám során az IL-6 és a receptora (IL-6R) genetikai állományában kimutatható egy pontú nukleotid polimorfizmusokat (SNP) illetve a komplement rendszer egyes elemeit tanulmányoztam, ez utóbbiakat a beteg első jelentkezésekor levett vérmintában illetve szekvenciálisan, a kórlefolyás során.

Célkitűzések

Masztocitózisban szenvedő betegeknél emelkedett szérumszint figyelhető meg, a betegség súlyossága korrelál az interleukin szérumban mérhető koncentrációjával.

Irodalmi ismeretek alapján a hízósejtek differenciálódására ható citokinek közül az IL-6, illetve IL-6R génállományában jelen lévő SNP-k az adott citokin szérumbeli

koncentrációját befolyásolja. A humán IL-6 gén a 7p21 kromoszómán lokalizálódik, a promóter régiójában bekövetkező -174 G/C SNP hatására megemelkedik az IL-6 szérumszintje. Az IL-6R exonjának funkcionális polimorfizmusa (Asp358Ala) az IL-6 membránhoz történő kapcsolódásának megváltozásához vezet. A szolubilis IL-6R szekvesztráción keresztül befolyásolja a szérumban mérhető IL-6-szintet.

Munkám során részben e génekben észlelhető egy pontú nukleotid polimorfizmusok frekvenciáját vizsgáltam a betegekben és egészséges kontrollokban.

A masztocitózis elkülönítő kórisméjében a diagnózis felállításához nélkülözhetetlen kizárni a komplement C1 inhibitor hiányt akár öröklött vagy szerzett formájában.

A nemzetközi irodalmat áttekintve nem található olyan közlemény, amelyben szisztematikusan felmérik a komplement rendszer főbb paramétereinek változását masztocitózisban szenvedő betegekben a kórlefolyás során. Ezért a rendelkezésünkre álló betegek mintáiban vizsgáltuk a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje). A dolgozatban két, részletesen bemutatott beteg kórlefolyása során vett mintákban követtem nyomon a komplement paraméterek lehetséges változásait.

Doktori munkám során a Semmelweis Egyetem (SE) Masztocitózis Hálózatban a tanulmány kezdetéig regisztrált magyar betegcsoport kor, nem és szérum triptáz szint szerinti összetételét is áttekintettem.

A betegség ritka előfordulása miatt a tanulmányban szereplő betegek száma - a nemzetközi irodalomban szereplőkéhez hasonlatosan alacsony. Nemzetközi (magyar, osztrák, és lengyel) hematológus kollégák összefogásával tudtuk a jelen dolgozat eredményeit szolgáltató 66 beteg mintáit begyűjteni, vizsgálni, majd elemezni. További betegek bevonásával, az esetszám emelésével, esetleg alcsoportokat kialakítva vizsgálatainkat ismételni szeretnénk. Az esetszám emelését csak hazai és nemzetközi centrumok összefogásával látjuk megvalósíthatónak.

Konkrét kérdések formájában az alábbiakat fogalmaztam meg:

1. az IL-6 gén -174 G/C polimorfizmus frekvenciájában kimutatható-e különbség a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között
2. az IL-6R gén ASP358Ala (A/C) polimorfizmus frekvenciájában kimutatható-e különbség a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között
3. kimutatható-e eltérés a betegek és egészséges kontrollok között a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően
4. a betegség kórlefolyása során megfigyelhető-e változás a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően
5. milyen a masztocitózisban szenvedő magyar betegcsoport nembeli, életkorbeli összetétele és szérum triptáz szintje egységesen, illetve alcsoportok szerint

Módszerek

Az IL-6 -174 G/C, és IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP vizsgálatokba Magyarországról (Budapest, SE Masztocitózis Hálózat), Ausztriából (Bécs) és Lengyelországból (Gdansk) vontunk be betegeket. Összesen 66, a WHO kritériuma szerint a masztocitózis több alcsoportjában szenvedő beteg került be (26 férfi, 40 nő; átlagéletkor 42,9 év; alcsoportok szerint 27 kután masztocitózis, 27 indolens szisztémás masztocitózis, 3 lappangó szisztémás masztocitózis, 6 szisztémás masztocitózis társuló nem masztocitózisos hematológiai betegséggel, 2 agresszív szisztémás masztocitózis, és 1 hízósejtes leukémia).

A komplement rendszer elemeit érintő elemzéseket a magyar beteganyag mintáiból végeztük el. A vizsgálatba 46 beteget (19 férfi, 27 nő; átlagéletkor 49,18 év; 25 kután forma, 21 szisztémás forma) vontunk be. Az alacsony betegszám miatt az esetek további alcsoportokba történő sorolását nem végeztük el.

A kontroll csoportba 99, nem rokon, a kaukázusi rasszhoz tartozó, malignus, és immunológiai betegségektől mentes, átlagos kórházi beteget (45 férfi, 54 nő;

átlagéletkor 68,0 év) választottunk. A kontroll populáció genotípus eloszlása Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. Az eset-kontroll vizsgálatok során a teljes kontroll minta nem és kor szerint illesztett szubpopulációit használtuk.

A vér-, DNS-, citológiai és szövettani minták nyérése során az illetékes szakmai kollégiumok ajánlásait követtük, a mintavételek a SE III. Belgyógyászati Klinika ambulanciáin, illetve fekvőbeteg osztályain történtek. A vérminták vizsgálata a SE III. Belgyógyászati Klinika laboratóriumában, a DNS minták genotipizálása és PCR vizsgálata, valamint a komplement rendszerrel kapcsolatos elemzések a SE III. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában, a szövettani minták feldolgoása a SE I. Patológiai Intézetében történtek.

Az *IL-6* gén Asp358Ala egy pontú polimorfizmus vizsgálatát fluorogénikus 5' nukleáz aktivitású TaqMan assay-vel végeztük. Az *IL-6R* gén -174 G/C (rs1800795) SNP meghatározása PCR-RFLP módszerrel történt, a 299 bázispár méretű szakaszt a 5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG-3' és a 5'-TCAGACATCTCCAGTCCTATA-3' primerrel sokszoroztuk.

A betegek mintáiban megvizsgáltuk és ELISA módszerrel meghatároztuk a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje).

Az adatainkat MedCalc 9.3.3.0. programot használva elemeztük. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérések és egyezések becslését és az asszociáció analízist chi-négyzet próbával végeztük, „GraphPad Prism v. 4.0” és „Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 13.0” programmal hajtottuk végre.

Eredmények

Az *IL-6* gén -174 G/C SNP-ban nem találtunk szignifikáns eltérést a betegek és a kontrollok között. Betegek körében a genotípus megoszlása: „GG” 18 fő (27,3%), „GC” 32 fő (48,5%), „CC” 16 fő (24,2%), allélmegoszlás: „G” 68 (51,5%), „C” 64 (48,5%); egészségesek körében a genotípus megoszlása: „GG” 36 fő (36,4%), „GC” 49 fő (49,5%), „CC” 14 fő (14,1%), allélmegoszlás: „G” 121 (61,1%), „C” 77 (38,9%); *p* érték 0,1988, illetve 0,0843.

Az *IL-6R* gén *Asp358Ala* (A/C) SNP vizsgálata során a betegek körében az „AA” genotípus és az „A” allél előfordulása szignifikánsan ritkább volt, mint az egészséges kontrollok között ($P=0,0317$ és $P=0,0229$). Az masztocitózis kialakulásának Odds rációja (OR) az „AA” genotípusúak körében 0,4019 volt (95% konfidencia intervallum (CI)= 0,2013-0,8021; $P=0,0088$), a „C” allél hordozása („AC” és „CC” genotípus) esetén a masztocitózis gyakrabban fordult elő (OR=2,488; 95% CI=1,247-4,967; $P=0,00888$).

Az *IL6* és *IL-6R* fent nevezett régiójában jelen lévő SNP frekvenciák együttes elemzése során megállapítottuk, hogy masztocitózisos megbetegedések leggyakrabban az *IL-6* gén -174 lókuszon kimutatható „GC” allél és az *IL-6R* gén „AC” allél együttes hordozása esetén fordult elő. Ez alapján feltételezzük, hogy e két genotípus együttes jelenléte védő hatást jelenthet a betegség kialakulásával szemben, mely pontos hatását jelenleg nem ismerjük. Feltételezésünk szerint különböző fakorok additív, esetleg szinergista módon befolyásolják a betegség kialakulását, melyben még további, jelenleg nem ismert egyéb tényezők is szerepet játszhatnak.

A hízósejtek aktivációjában, a kemotaxisuk mértékében, a hisztamin felszabadulásban és a hízósejt függő gyulladásos válaszban elengedhetetlen a komplement rendszer bizonyos elemeinek –C3, C3a, C3b, C3d, C4, C4a, C5a, - aktív közreműködése. Doktori munkám során elemeztük a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje). Nem találtunk összefüggést a masztocitózis betegség különböző alcsoportjaiban szenvedők és egészséges kontrollok között a komplement rendszer vizsgált paramétereit illetően.

Tekintettel a betegség ritka előfordulására, lényegesnek tartottam a gondozásunk alatt álló betegek közül két, differenciáldiagnosztikai nehézségeket okozó esetet részletesebben ismertetni. Ezen kórtörténetek bemutatása a következőkben történik.

I. számú betegünk egy 81 esztendőes férfi, akinek anamnézisében világos sejtes veserák szerepel. A beteg klinikánkon 40 éve fennálló tünetek miatt jelentkezett. Tünetei között a tözsön kialakult makulopapulózis elváltozás, pluritusz, vizes hasmenés és rendszeresen visszatérő, légzesi elégtelenséget okozó, terápiareszisztens mellúri

foliadékgyülem szerepelt. A beteg csontvelői kenetében és a vastagbél metszetében igazoltunk hízósejtes infiltrációt, és klaszterképződést. A hízósejtek egynegyede a normálistól eltérő morfológiájú volt. A CD 117, CD 2, CD 25 hármass ko-expressziót áramlási citometriával igazoltuk. A beteg szérumban triptáz szintje a 20 ng/ml értéket többszörösen meghaladta (661 ng/ml). A DNS vizsgálat c-KIT 17 exon 798 kodon 81350 lókuszban igazolt csendes mutációt. Fentiek alapján betegünk a major kritériumnak, és a négy minor kritérium közül háromnak megfelelt. Betegünk követése során a vizsgált komplement paraméterek változása nem követte a kórfolyamat során jelentkező akut állapotváltozásokat.

II. számú betegünk egy 78 esztendősnő volt, anamézisében 2-es típusú diabétesz mellitusz, hipotireózis, IgG kappa típusú monoklonális gammopátia és esszenciális trombocitopenia szerepelt. Fizikális vizsgálat során a törzsön és a végtagokon is jelen lévő barnásvörös papulákat észleltünk, jelentős máj- és lépmegegyagyobbodás mellett. Betegünk légzési diszkomfortja háttérében radiológiailag igazolt, jelentős mennyiségű, a bal alsó tüdőlebenyt összenyomó folyadék állt. A beteg esetében a csontbiopszia szövettani vizsgálata kifejezett hízósejtes infiltrációt igazolt. A beteg triptáz szintje 200 ng/ml volt, mely a normálértéket (20 ng / ml alatt) jelentősen meghaladta. Ez alapján a beteg egy major és két minor kritériumnak felelt meg. Molekuláris genetikai vizsgálatok D816V c-KIT mutációt igazoltak a 17-es lókuszban. A beteg komplement analízise során C1-inhibitor (INH)-, és C1q-ellenes antitesteket nem detektáltunk, a C1q szérumszintje a normálistól inkább magasabb volt. Az alacsony normál CH50, C3, C4 szintjei miatt esetleges komplement konszumpciók kimutatása céljából komplement fogyasztásos tesztet végeztünk, de konszumpció nem igazolódott.

A *SE Masztocitózis Hálózatban* a tanulmány kezdetéig regisztrált magyar betegcsoport kor, nem és szérumban triptáz szint szerinti összetételét is áttekintettem.

Alcsoportok szerint a hazai betegek (66 fő) körében 27 kután masztocitózis (40,91%), szisztémás masztocitózis 39 esetben (59,09%) fordult elő.

Betegeink *nembeli összetétele* szerint 26 fő férfi (39,39%), 40 fő nő (60,61%). A betegeket *életkor szerint* áttekintve megállapítottuk, hogy a legfiatalabb betegek a kután masztocitózis csoportban fordulnak elő (átlagéletkor 34,74 év), míg a legidősebbek a szisztémás masztocitózis társuló hematológiai nem masztocitózisos betegségben

(átlagéletkor 65,7 év) és az agresszív szisztémás masztocitózisban (átlagéletkor 77,5 év) szenvedők körében voltak.

A *szérum triptáz szint* meghatározását 46 fő (27 nő és 19 férfi) esetében tudtuk elvégezni, külföldi laboratóriumokban. Az összes betegre vonatkoztatva az átlagérték 210,48 ng/ml volt, a két szélső érték 2,14 és 2357 ng/ml volt. A legmagasabb szérum triptáz szintet (2357 ng/ml) agresszív szisztémás masztocitózis esetében mértük, a legalacsonyabbat (2,41 ng/ml) kután forma esetében mértük. Átlagos értékekkel a kután, az indolens és a lappangó masztocitózis esetében tudunk dolgozni (egyéb csoportokba 1-1 eset került). Az alcsoportokon belül a kután formában igazoltuk a legalacsonyabb (21,5 ng/ml), indolens formánál a közepes (112,0 ng/ml), és szmoldering formában a legmagasabb (937 ng/ml) értéket. Ezek alapján megerősítettük azt az irodalomból ismert adatot, hogy a szérumban mért triptáz szintje és a betegség súlyossága közötti összefüggés van.

Következtetések

Az IL-6 gén -174 G/C polimorfizmus frekvenciájában nem mutatható ki szignifikáns eltérés a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között.

Az IL-6R gén ASP358Ala (A/C) polimorfizmus frekvenciájában igazoltunk szignifikáns különbséget a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között.

Az IL6 és IL-6R génpolimorfizmusának együttes elemzése során megállapítottuk, hogy betegség leggyakrabban az IL-6 gén GC allél és az IL-6R gén AC allél együttes hordozása esetén jelentkezik.

A komplement rendszer paramétereinek elemzése során nem igazoltunk eltérést a betegek és egészséges kontrollok között a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően.

A betegség kórlefolyása során nem mutattunk ki változást a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően.

Egy esetben igazoltuk, hogy az alacsony CH50-, a C3-, a C4 koncentráció nem a fokozott konzumpció következménye.

A masztocitózisban szenvedő magyar betegcsoport elemzése során azt találtuk, hogy a betegség agresszív formái jellemzően 70 év felett fordultak elő. A betegség nembeli összetételének elemzése alapján női nemi dominanciát találtunk, mely az immunológiai betegségekre jellemző.

Saját publikációk jegyzéke

1. **Rausz E**, Szilágyi A, Nedoszytko B, Lange M, Nedoszytko M, Lautner-Csorba O, Falus A, Aladzsity I, Kokai M, Valent P, Marschalko M, Hidvégi B, Szakonyi J, Csomor J, Várkonyi J: Comparative analysis of IL6 and IL6 receptor gene polymorphisms in mastocytosis, British Journal of Haematology, 160, 2, 216-219, 2013.
2. Várkonyi J, **Rausz E**, Pánczél P, Sperlag M, Varga L., Farkas H, Csomor J, Füle T, Karadi I: Coexistent systemic mastocytosis and essential thrombocythemia complicated with monoclonal gammopathy and hypocomplementaemia, Central European Journal of Medicine, 7, 6, 742-746, 2012.
3. **Rausz E**: Szisztémás masztocitózis, Orvostudományok. Közlésre elfogadva.